

## スフィンゴシン-1-リン酸2型受容体は リポ多糖により誘発される急性肺損傷を抑制する

金沢大学大学院医学系研究科循環医学専攻血管分子生理学

(旧講座名：生理学第一)

(主任：多久和陽教授)

崔

弘

急性肺損傷 (acute lung injury) は、急性呼吸促迫症候群 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) とも呼ばれ、敗血症などを基礎疾患として発症し、肺実質への白血球の浸潤、肺毛細血管透過性亢進、肺水腫とそれによる肺機能障害を特徴とする重篤な急性びまん性炎症性疾患である。急性肺損傷に対しては、未だ十分な治療法はない。急性肺損傷では、血管透過性を抑制することにより、白血球浸潤と肺浮腫を抑制できる可能性がある。血管内皮に存在する脂質メディエータースフィンゴシン-1-リン酸 (sphingosine-1-phosphate, S1P) 特異的2型受容体 (S1P<sub>2</sub>) に着目し、S1P<sub>2</sub>遺伝子ノックアウトマウスを用いて急性肺損傷におけるS1P<sub>2</sub>の役割を検討した。リポ多糖 (lipopolysaccharide, LPS) の気道内投与による炎症性細胞の浸潤、肺胞浮腫を特徴とした血管透過性亢進型急性肺損傷は、野生型マウスに比較してノックアウトマウスでより高度であった。肺胞洗浄液中のタンパク濃度と好中球の増加及び肺におけるサイトカイン発現もノックアウトマウスでより高度であった。LPS投与は静脈内に投与したエバンスブルー色素あるいは蛍光イソチオシアネート (fluorescein isothiocyanate, FITC) 標識デキストランの血管外漏出を引き起こしたが、これはノックアウトマウスでより高度であった。LPS投与後の肺湿重量の増加もノックアウトマウスで有意に高値であった。一酸化窒素 (nitric oxide, NO) は内皮細胞間透過性を亢進させる。NO合成酵素阻害薬の投与は、ノックアウトマウスで見られるLPSによる急性肺損傷の増悪を改善した。以上の結果は、S1P<sub>2</sub>がNO合成抑制を介して血管バリア維持を含む機構により急性肺損傷を軽減する可能性を示唆する。S1P<sub>2</sub>は急性肺損傷の新しい治療標的となりうる。

**Key words** スフィンゴシン-1-リン酸, スフィンゴシン-1-リン酸2型受容体, 急性肺損傷, 血管透過性, 一酸化窒素

スフィンゴシン-1-リン酸 (sphingosine-1-phosphate, S1P) は血管内皮細胞やリンパ球をはじめ様々な細胞種に対して、細胞増殖、細胞運動、細胞間接着、細胞分化など多彩な作用を及ぼす脂質メディエーターである<sup>1)2)</sup>。S1Pは血中やリンパ液中に約 $10^{-6}$  Mオーダーの濃度で存在し、血中S1Pの大部分は、アルブミンや高密度リポタンパク質に結合して存在する<sup>3)</sup>。S1Pは赤血球、血管内皮細胞やその他の細胞において、スフィンゴシンキナーゼ (sphingosine kinase, SphK) 1/2によりリン酸化を受けて生成され、細胞膜輸送体により細胞外に輸送される<sup>3)~7)</sup>。S1Pはまた、細胞内でS1Pリ

アーゼ (S1P lyase, SPL) やS1Pホスファターゼ (S1P phosphatase, SPP) により分解される<sup>8)9)</sup>。ほとんどのS1Pの生物活性は5種類のGタンパク質共役型受容体S1P<sub>1-5</sub>を介する<sup>10)</sup>。これらの受容体の中で、S1P<sub>1</sub>、S1P<sub>2</sub>、S1P<sub>3</sub>は全身のほとんどの臓器・組織に広範に発現している主要な受容体である<sup>1)2)</sup>。これらのS1P受容体の作用の中で、特に細胞遊走については受容体サブタイプ別に作用が異なり、S1P<sub>1</sub>は三量体Gタンパク質G<sub>i</sub>を介して低分子量Gタンパク質Racを活性化することによりS1Pに対する化学遊走を促進し、一方、S1P<sub>2</sub>は三量体Gタンパク質G<sub>12/13</sub>を介して低分子量Gタンパク質Rhoを

平成24年10月1日受付, 平成24年10月15日受理

Abbreviations : BALF, bronchoalveolar lavage fluid; eNOS, endothelial NOS; FITC, fluorescein isothiocyanate; IL-6, interleukin-6; iNOS, inducible NOS; L-NAME, N $\omega$ -nitro-L-arginine methyl ester; LPS, lipopolysaccharide; MCP-1, monocyte chemotactic protein-1; nNOS, neuronal NOS; NO, nitric oxide; NOS, NO synthase; PAF, platelet-activating factor; S1P, sphingosine-1-phosphate; SphK, sphingosine kinase; SPL, S1P lyase; SPP, S1P phosphatase; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ ; VEGF, vascular endothelial growth factor-A

活性化し、Racを抑制することにより化学遊走を強力に抑制する<sup>1)2)11)12)</sup>.

急性肺損傷 (acute lung injury) は、急性呼吸逼迫症候群 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) と呼ばれ、死亡率の高い急性肺疾患であり、敗血症、重度の外傷および肺脂肪塞栓症などの様々な基礎疾患に続発し、肺での複雑な炎症反応により、肺血管透過性の亢進と肺組織の破壊をきたすとされている<sup>13)14)</sup>. その結果、非心原性肺水腫および肺コンプライアンス低下が生じ、さらには、重篤な呼吸不全および低酸素血症を発症する. ARDS は、重篤な血管透過性亢進型肺損傷の最終病態像である<sup>13)14)</sup>.

近年、急性肺損傷においてS1Pの関与が注目されている. S1PやS1P<sub>1</sub>アゴニスト投与はリポ多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 誘発性急性肺損傷における肺血管の透過性をin vivoにおいて低下させること<sup>15)–17)</sup>, SphK1 ノックアウトマウスではLPSによる肺水腫やサイトカイン産生が増強すること<sup>18)</sup>, さらにSPL阻害剤投与やSPL遺伝子ヘテロノックアウトによるS1Pの分解抑制はLPSによる肺損傷や炎症を抑えることが示された<sup>19)</sup>. 以上の結果は、S1Pが急性肺損傷における肺血管の透過性や炎症に対して保護的に働くことを示している.

S1Pは血管内皮細胞のバリア機能を強化することにより血管透過性を抑制することが知られている<sup>20)</sup>. この血管透過性抑制作用 (バリア機能強化作用) には、S1P<sub>1</sub>によるRac活性化を含む機序を介したVE-カドヘリンや $\beta$ -カテニンなどからなるアドヘレンス結合組み立て作用が重要と考えられている<sup>21)</sup>. Sphk1とSphK2の造血幹細胞特異的欠損により血中のS1Pが著しい低値 (～100nM) を呈するマウスでは、血管内皮のバリア機能が低下し、定常時および炎症時ともに血管透過性が亢進すること、さらにS1P<sub>1</sub>アゴニストの投与がこの血管透過性作用の亢進を抑制することが示された<sup>22)</sup>. 培養内皮細胞ではS1P<sub>2</sub>の発現はS1P<sub>1</sub>と比較してはるかに低値もしくは検出限界以下であり、S1P<sub>2</sub>を過剰発現させるとRhoの活性化およびRac抑制を介して透過性促進が生ずることが報告された<sup>23)</sup>. しかし、組織染色に利用できる抗S1P<sub>2</sub>抗体がないために、インビボにおいて様々な組織の血管がS1P<sub>2</sub>を発現しているか否かは全く不明であった. 最近、著者の研究室ではS1P<sub>2</sub>遺伝子座に $\beta$ -ガラクトシダーゼ ( $\beta$ -galactosidase, *LacZ*) 遺伝子を挿入したマウスを作製・解析し、S1P<sub>2</sub>の生体内における発現を*LacZ*活性染色により検討したところ、S1P<sub>2</sub>は肺胞毛細血管や様々な臓器・組織の血管壁 (血管内皮・血管平滑筋の両者) に発現していた<sup>24)</sup>. また著者らは最近、S1P<sub>2</sub>遺伝子欠損 (*S1pr2*<sup>-/-</sup>) マウスアナフィラキシーモデルの研究から、血管内皮細胞に発現するS1P<sub>2</sub>が内皮型一酸化窒素合成酵素 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) の抑制を介して血管透過性を抑制することを見出した (崔弘ら、未発表).

本研究では、血管内皮細胞に発現しているS1P<sub>2</sub>に注目し、*S1pr2*<sup>-/-</sup>マウスを用いてLPS誘発急性肺損傷モデルを作成し、肺の病理学的所見、肺胞への炎症細胞の浸潤、肺における炎症性サイトカインのmRNA発現、および肺血管透過性などを解析することにより急性肺損傷におけるS1P<sub>2</sub>の役割を検討した. その結果、*S1pr2*<sup>-/-</sup>マウスでは野生型マウスに比較して、肺血管透過性亢進および炎症細胞の浸潤を伴ったLPS誘発肺損傷が増悪していることおよび一酸化窒素 (NO) 合成酵素阻害剤投与がこれらの作用を抑制することが見出された. これらの観察から、S1P<sub>2</sub>はNO産生の抑制を介して肺血管透過性を抑制することによりLPS誘発肺損傷に対して防御的に作用することを初めて明らかにできた.

## 材料および方法

### I. 試薬

本研究に使用した主要試薬の入手先は以下の通りである. 蛍光イソチオシアネート (fluorescein isothiocyanate, FITC) 標識デキストラン (分子量70kDa), LPS及びNG-ニトロアルギニンメチルエステル (*N $\omega$* -nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME) (Sigma Chemical, St. Louis, USA), エバンスブルー色素, ジエチルエーテル, パラホルムアルデヒド及びホルムアミド (和光, 大阪), 血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor-A, VEGF) (PeproTech Inc., Rocky Hill, USA).

### II. 実験動物

実験には8～10週齢雄及び雌 (体重22～25g) のS1P<sub>2</sub>遺伝子欠損 (*S1pr2*<sup>-/-</sup>) マウスおよび同腹の野生型マウスを用いた<sup>24)</sup>. これらの動物は金沢大学学際科学実験センター実験動物施設内で24℃, 湿度60%以下, 12時間消灯–12時間点灯サイクルの条件下で飼育した. すべての遺伝子組換え動物実験は金沢大学遺伝子組換え実験安全委員会および動物実験委員会の承認を受け, ガイドラインに従い実施した (遺伝子組換え実験計画: 平成22年4月27日承認, 金大6第1081号, 「遺伝子改変マウスを用いたスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) の生理学的・病態生理学的解析」, 動物実験計画: AP-101574, 平成22年4月10日承認, AP-111846, 平成23年3月23日承認, AP-122284, 平成24年4月3日承認, 「遺伝子改変マウスを用いた血管透過性における生理活性脂質スフィンゴシン-1-リン酸情報伝達系の病態生理学的役割の検討」).

マウスの遺伝子型の確認はPCRによって行った<sup>24)</sup>. 標準的な手法によってマウスの尾から回収したゲノムDNAをPCRのテンプレートとして用いた. S1P<sub>2</sub>遺伝子欠損アリルおよび野生型アリルを検出するために以下の三種類のプライマーを使用した<sup>24)</sup>.

Forward1; 5'-cggttgctaccgcgtgatatt-3'

Reverse1; 5'-cctccagaaatgtcgggtgat-3'

Forward2; 5'-atcctggggctggaattgtct-3'

PCRは、94℃ 30秒, 59℃ 45秒, 72℃ 60秒のサイク

レを40回繰り返した。

### III. 急性肺損傷モデル

LPS (4mg/kg 体重) を気管内投与してLPSによるマウス急性肺損傷モデルを作成した。まず、エーテル麻酔下にてマウスの喉部皮膚を切開して気管を露出し、17ゲージ針を装着したテルモシリンジを用いてLPS溶液 (10mg/ml生理食塩水) を気道内に投与した。LPS投与終了後、皮膚切開部を縫合した。NO合成酵素阻害剤L-NAME (25mg/ml生理食塩水) はLPS投与10分前に尾静脈より注入した (図9, 図10及び図11の実験)。

### IV. 肺の病理組織学的解析

経気道的LPS投与後12あるいは24時間 (図1, 図9) で、ペンタバルビタール (共立製薬株式会社, 東京) (50mg/kg, i p) 深麻酔にてマウスを安楽死させた後、左心房に切開を加えてから4%パラホルムアルデヒド (0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) に溶解) 液を右心室に注入して肺を灌流固定した。肺を取り出した後に、4%パラホルムアルデヒド液中で24時間以上さらに固定した後、パラフィン包埋、薄切し、常法に基づきHE染色を行った。

### V. 血管透過性の解析

#### 1. エバンスブルー色素漏出法

経気道的LPS投与後5時間あるいは23時間 (図5, 図10) で、エーテル麻酔下に100  $\mu$ lのエバンスブルー色素液 (生理食塩水に1%の濃度で溶解) を尾静脈より注入した。1時間後に上記IVに記載の方法によりマウスを安楽死させた後、左心房に切開を加えてから生理食塩水を右心室から注入して灌流を行い、血管内のエバンスブルー色素を取り除いた。その後、肺を摘出した。摘出肺は写真撮影後、60℃にて24時間乾燥させた後、乾燥重量を測定した。肺組織にホルムアミドを1ml添加し、4日間室温でエバンスブルー色素を抽出し、620nmと500nmにおける吸光度からOD620-OD500式に基づいてエバンスブルー色素値を算出した。得られた値は乾燥重量当りの量として表した。

#### 2. 肺組織の乾燥重量/湿重量比の測定

経気道的LPS投与後24時間に上記の方法でマウスを安楽死させ、すばやく肺を摘出した。摘出肺の重量 (湿重量) を測定後、60℃にて24時間乾燥させた後乾燥重量を測定し、肺組織の乾燥重量/湿重量比を求めた。

#### 3. Miles アッセイ

エーテル麻酔下に100  $\mu$ lのエバンスブルー色素液 (生理食塩水に1%の濃度で溶解) をマウス尾静脈より注入した。10分後に除毛したマウス背部の皮下に、PBSもしくはVEGF液 (0.5及び1ng/ml PBS) をそれぞれ100  $\mu$ l注入した。20分後に上記の方法でマウスを安楽死させ、すばやくマウス背部の薬剤注入部を含む皮膚を切除した。写真撮影後、皮膚組織にホルムアミドを0.4ml添加し、4日間室温でエバンスブルー色素を抽出し、上記1の方法により定量した。血管透過性は、注入部当りの漏出エバンスブルー色素量として表した。

### 4. FITC標識デキストランによる血管漏出の測定

経気道的LPS投与後24時間で、エーテル麻酔下に100  $\mu$ lのFITC標識デキストラン溶液 (7.5mg/ml, 30mg/kg 体重) をマウス尾静脈より注入した。30分後に上記の方法でマウスを安楽死させた後、上記IVの方法を用いて肺を灌流固定し、肺を摘出した。摘出肺を凍結組織包埋剤OCTコンパウンド (Sakura Fine Chemical, 東京) に包埋し、凍結切片を作成した。凍結切片は乾燥・アセトン固定した後、DAPI (4, 6-diamidino-2-phenylindole) で核染色を行い、サンプルを退色防止剤で封入し、共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss LSM510 Pascal) を用いてFITC標識デキストランの漏出を観察した。1切片あたり無作為に3視野を選び、Image-Jソフトウェアを用いて各視野あたりのFITC陽性面積 (pixel) をもとめ、視野の総面積当たりの%値として表示した。

### VI. 気管支肺胞洗浄液の調製と解析

#### 1. 気管支肺胞洗浄液の採取

経気道的LPS投与後12時間あるいは24時間 (図2, 図11) で気道洗浄を行い、気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) を採取した。まず、上記の方法でマウスを安楽死させた後に腹大動脈切断により放血させた。すばやくマウス気管上部より18ゲージ針を挿入し、テルモシリンジにて生理食塩水0.8mlを気管内に注入し採取した。この作業を4回繰り返し、注入総量 (3.2ml) の約90%以上のBALFを回収した。回収量は実験群間で差は認めなかった。回収したBALFは遠心 (450  $\times$  g, 4℃, 10min) により沈渣 (細胞成分) と上清に分離した。

#### 2. BALFの細胞分画の分析

沈渣に生理食塩水1mlを加えて細胞を懸濁し、血球計数板を用いて光学顕微鏡下で細胞数を計測した。残りの沈渣溶液は総細胞数が10万個になるように調整し、塗抹標本を作成した。塗抹標本はDiff Quick (国際試薬株式会社, 東京) で染色した。1標本あたり100個の細胞を数え、好中球の割合を算出した。

#### 3. BALF中総タンパク量の測定

Lowry法によりBALF中の総タンパク量を測定した。ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) (和光, 大阪) を用いて検量線を作成した。

### VII. 定量的PCR

#### 1. 総RNAの抽出

経気道的LPS投与後6時間で、上記IVに記載の方法でマウスを安楽死させた後にすばやく腹大動脈切断により放血させ、肺を摘出した。TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA) を用いて、摘出肺から総RNAを抽出した。

#### 2. 定量的PCR反応

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster, USA) を用いて逆転写反応を行い、2  $\mu$ gの総RNAからcDNAを合成した。その産物の1/5量を用いて、定量的PCR反応を行った。MESA

Green qPCR MasterMix Plus (Eurogentec, Seraing, Belgium) 試薬を用い, ABI PRISM 7300 sequence detection system (Applied Biosystems) で定量的PCR反応を行った. PCRは, 94 °C 15秒, 60 °C [腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ ) のみ58 °C] 60秒のサイクルを40回繰り返した. LPS投与群とコントロール群および *S1pr2*<sup>-/-</sup>マウスと野生型マウスの間の遺伝子発現の比較は, 比較Ct法 ( $\Delta\Delta$ CT法) を用いた相対的定量化により行った. 内因性コントロール遺伝子として  $\beta$ -アクチンを用いた.

使用したプライマーは表1に示す.

## VIII. 統計処理

測定値はすべて平均値±標準偏差で表した. 有意差検定は, 二元配置分散分析, post hoc test 検定には Bonferroni法を用い, 危険率5%未満を統計学的に有意と判定した. 加えて, 図3は Mann-Whitney法を用いて解析した. これらの統計処理には Prism 5 software (GraphPad Software, San Diego, USA) を使用した.

## 成 績

### I. LPS誘発肺損傷の *S1pr2*<sup>-/-</sup>マウスにおける増悪

*S1pr2*<sup>-/-</sup>マウス及び野生型マウスの気道内にLPSを投与し, 肺組織の病理組織学的変化を検討した. LPS投与24時間後では野生型マウス, *S1pr2*<sup>-/-</sup>マウスいずれの肺組織においても, 炎症細胞の浸潤, 間質肥厚, 肺胞浮腫を特徴とした血管透過性亢進型急性肺損傷の病理像

Table 1. Primers pairs used in real-time PCR

Gene	Primer pair sequences (forward/reverse)
TNF- $\alpha$	5'-gacctcactcagatcatcttc-3' 5'-cgctggtcagccactcc-3'
IL-6	5'-ccggagaggagacttcacag-3' 5'-tccacgatttcccagagaac-3'
MCP-1	5'-cttctccaccacat-3' 5'-actgcactctggtgagcca-3'
S1P <sub>1</sub>	5'-aaatgcccacacggagact-3' 5'-ctgatttgcgtgcgctaattc-3'
S1P <sub>2</sub>	5'-gccatcgtggtgagaattt-3' 5'-aggtagattgctgagtgaacttg-3'
SphK1	5'-cgtggacctcgagagtgaag-3' 5'-aggcttgcctagcgaaagaag-3'
SphK2	5'-acagaacatgcccgtag-3' 5'-aggtaacaccgacaacctg-3'
SPL	5'-gttgggcgcgcttgatg-3' 5'-gatgatctgtttgtagcttcaaca-3'
SPP1	5'-cccattggtggacctgattg-3' 5'-gatgagcggcgcatatttg-3'
$\beta$ -actin	5'-aggatcatcattggcaacga-3' 5'-cacttcatgatggaattgaatgtagtt-3'

を認めた (図1). その程度は野生型マウスと比べて *S1pr2*<sup>-/-</sup>マウスで顕著であり, この結果はS1P<sub>2</sub>遺伝子欠損がLPSによる肺損傷を悪化させることを示している.

次に, LPSによる肺胞腔への炎症波及をBALF中総タンパク質濃度およびBALF中総細胞数またBALF中好中球数の測定により, 評価した. 野生型マウス及び *S1pr2*<sup>-/-</sup>マウスにおいて, LPS投与により, BALFにおける総タンパク質濃度 (図2A), 総細胞数 (図2B) 及び好中球数の割合 (図2C, D) はいずれも有意に増加した (生理的食塩水投与群との比較において, 野生型マウス, *S1pr2*<sup>-/-</sup>マウスいずれにおいても  $P < 0.0001$ ). また野生型マウスと *S1pr2*<sup>-/-</sup>マウスの比較では, *S1pr2*<sup>-/-</sup>マウスの総タンパク質濃度, 総細胞数及び好中球数の割合はそれぞれ野生型マウスの約1.3倍 ( $P < 0.001$ ), 約1.3倍 ( $P < 0.001$ ), 約1.2倍 ( $P < 0.001$ ) 高値であった.

さらに, 定量的PCR法を用いて, LPS投与マウスの肺における炎症性サイトカインのmRNA発現を解析した. 野生型マウス及び *S1pr2*<sup>-/-</sup>マウス両者において, LPS投与により炎症性サイトカインIL-6 (図3A), MCP-1 (図3B) および TNF- $\alpha$  (図3C) のmRNA発現が増加した. また野生型マウスと *S1pr2*<sup>-/-</sup>マウスの比較では, LPS投与後のMCP-1発現が *S1pr2*<sup>-/-</sup>マウスにおいてより高値の傾向があった ( $P=0.11$ ).

LPS投与により発現が増加する遺伝子としてS1P合成酵素SphK1が報告されている<sup>18)</sup>. そこで, LPS投与によるスフィンゴ脂質代謝酵素のmRNA発現変化について検討した. 野生型マウス, *S1pr2*<sup>-/-</sup>マウス両者において, LPS投与によりS1P合成酵素SphK1のmRNA発現が増加した (野生型マウス:  $P < 0.001$ , *S1pr2*<sup>-/-</sup>マウス:  $P < 0.001$ ) (図4A). また, S1P分解酵素SPP1のmRNA発現は, 逆にLPS投与により低下した (野生型マウス:  $P < 0.001$ , *S1pr2*<sup>-/-</sup>マウス:  $P < 0.01$ ) (図4C). 野生型マウスと *S1pr2*<sup>-/-</sup>マウスの比較では, LPS投与を受けた *S1pr2*<sup>-/-</sup>マウスは野生型マウスに比較してSphK1mRNA発現が約1.8倍高値であった ( $P < 0.01$ ) (図4A). SPP1のmRNA発現変化は, 両マウスで同程度であった. SphK2とSPLのmRNA発現は, いずれのマウスでもLPS投与により変化しなかった (図4B, D). さらに, S1P受容体のmRNA発現についても検討したが, S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub>の発現はLPS投与により変化しなかった (図4E, F). S1P<sub>2</sub>の発現は, *S1pr2*<sup>-/-</sup>マウスでは検出されなかった.

### II. LPSによる肺血管透過性亢進および肺水腫の *S1pr2*<sup>-/-</sup>マウスにおける増悪

静脈内に投与したエバンスブルー色素の肺血管外漏出量を指標に, LPS投与による肺血管透過性亢進を評価した. 野生型マウス及び *S1pr2*<sup>-/-</sup>マウス両者において, LPS投与マウスの肺は青色調を呈し (図5A), LPS投与により肺組織中のエバンスブルー漏出量は増加した (生理的食塩水投与群との比較において, 野生型マウス:

$P < 0.01$ ,  $S1pr2^{-/-}$ マウス:  $P < 0.001$ ) (図5B). これらの所見は, LPSによる肺血管透過性の亢進を示した. 野生型マウスと  $S1pr2^{-/-}$ マウスの比較では, 生理的食塩水投与では両群マウスのエバンスブルー漏出には差は見られなかったが, LPS投与後のエバンスブルー漏出は  $S1pr2^{-/-}$ マウスでは野生型マウスの約1.6倍に増加していた( $P < 0.001$ ).

LPS誘発肺損傷における肺血管透過性亢進を, FITC標識デキストランの肺血管外漏出を指標にさらに検討した. 野生型マウス及び  $S1pr2^{-/-}$ マウス両者において, LPS投与により FITC 標識デキストランの肺血管外漏出が増加した (生理的食塩水投与群との比較において, 野生型マウス:  $P < 0.01$ ,  $S1pr2^{-/-}$ マウス:  $P < 0.001$ ) (図6). 野生型マウスと  $S1pr2^{-/-}$ マウスの比較では,

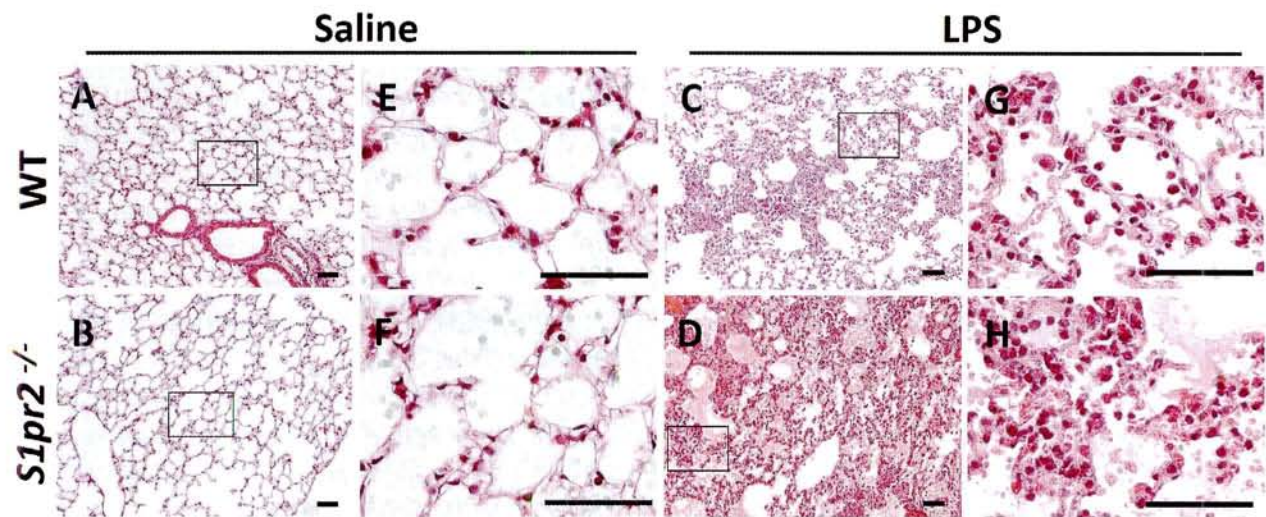


Fig. 1. Effects of  $S1P_2$  deficiency on LPS-induced acute lung injury. Representative images of HE-stained sections of lung ( $n = 2$  mice per group). (magnification x200 for A-D, x1000 for E-G). LPS induced pulmonary edema, alveolar wall thickness, and leukocytes infiltration in lung tissues (C,D,G and H). Bar=50  $\mu$ m.

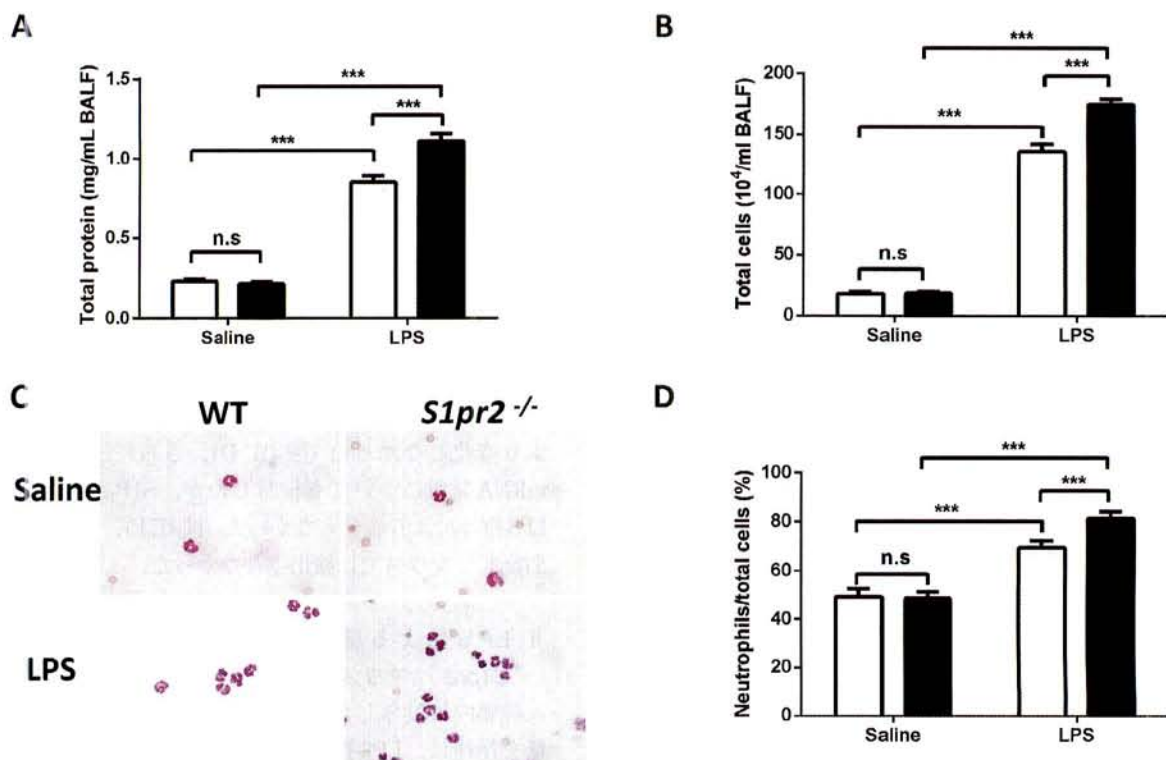


Fig. 2. Effects of  $S1P_2$ -deficiency on LPS-induced increase in total protein concentration, total cell number and neutrophil infiltration in BALF. (A) Total protein concentration in BALF. (B) Total cell number in BALF. (C) Representative images of smear preparations of cells in BALF. (D) Percent of neutrophils in BALF. BALF was prepared from mice with or without LPS challenge. The open and closed bars represent WT and  $S1pr2^{-/-}$  mice, respectively. Data represent the  $\bar{x} \pm$  SEM ( $n = 4$  mice per group in (A) and (B);  $n = 5$  mice per group in (C) and (D)). The symbol \*\*\* denote statistical significance at the level of  $P < 0.001$ . n.s, not significant.



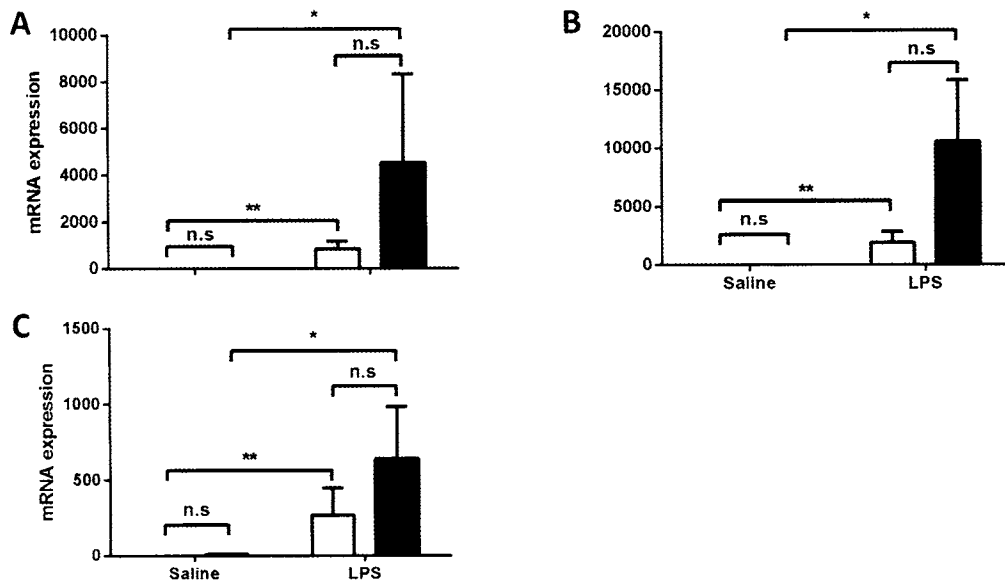


Fig. 3. mRNA expression of inflammatory cytokines in lung with or without LPS challenge. mRNA expression levels of (A) IL-6, (B) MCP-1 and (C) TNF- $\alpha$  in lung from mice with or without 6 hour LPS challenge were determined by real-time PCR.  $\beta$ -actin was used as an endogenous control. Data are expressed as multiples over values of saline-treated WT mice, which are expressed as 1.0. Data represent the  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  ( $n = 4$  or 5 mice per group in (A), (B), (D), (E) and (F);  $n = 3$  mice per group in (C)). The open and closed bars represent WT and *S1pr2*<sup>-/-</sup> mice, respectively. The symbols \* and \*\* denote statistical significance at the levels of  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively. n.s., not significant. The P value for the comparison of MCP-1 mRNAs in LPS-treated WT and *S1pr2*<sup>-/-</sup> mice was 0.11.

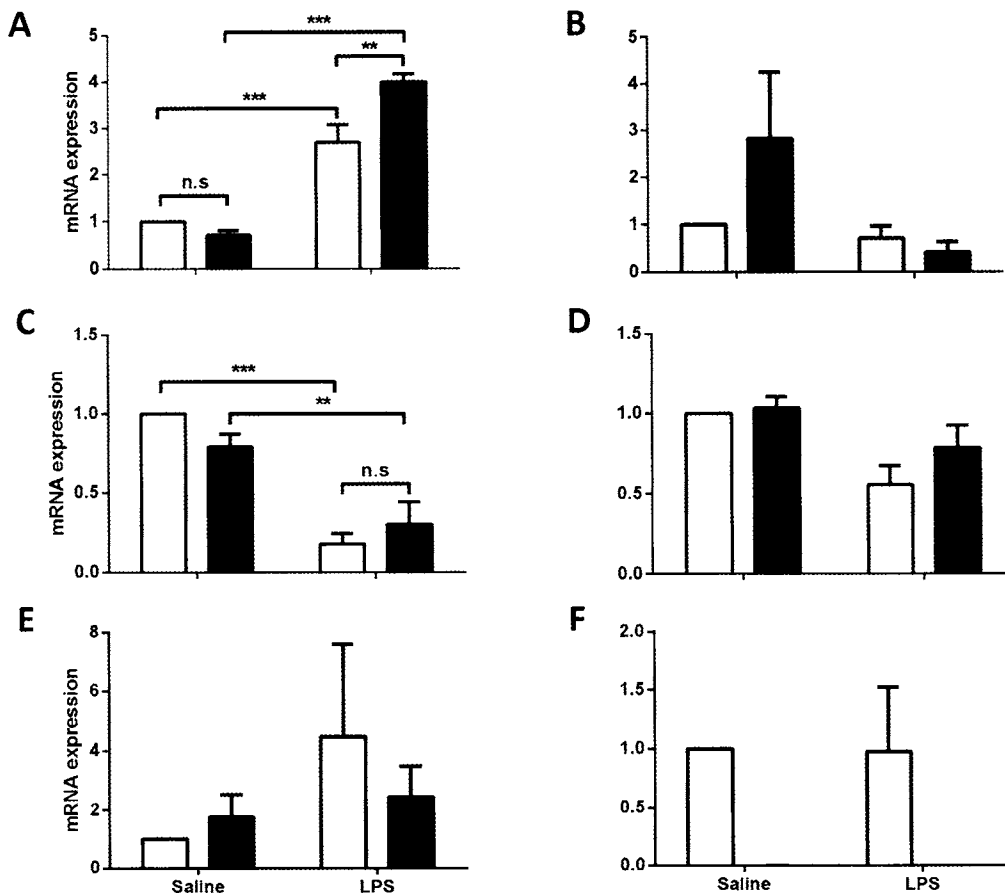


Fig. 4. mRNA expression of S1P receptors and sphingolipid-metabolizing enzymes in lung with or without LPS challenge. mRNA expression levels of (A) SphK1, (B) SphK2, (C) SPP1, (D) SPL, (E) S1P<sub>1</sub> and (F) S1P<sub>2</sub> in lung from mice with or without 6 hour LPS challenge were determined by real-time PCR.  $\beta$ -actin was used as an endogenous control. Data are expressed as multiples over values of saline-treated WT mice, which are expressed as 1.0. Data represent the  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  ( $n = 4$  or 5 mice per group). The open and closed bars represent WT and *S1pr2*<sup>-/-</sup> mice, respectively. The symbols \*\* and \*\*\* denote statistical significance at the levels of  $P < 0.01$  and  $P < 0.001$ , respectively. n.s., not significant. In (B), (D) and (E), there was no statistically significant difference in the comparison of any pair of two groups.

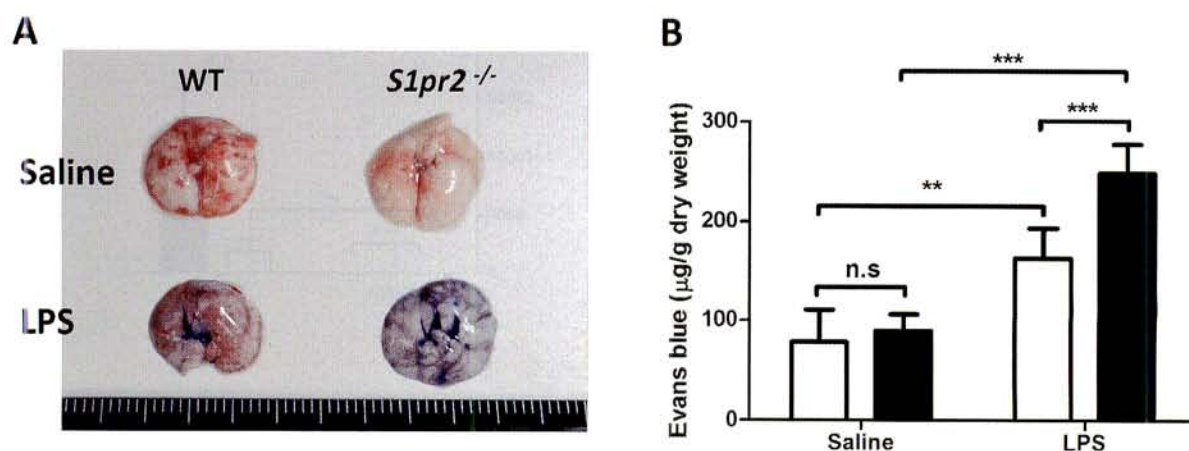


Fig. 5. Effects of S1P<sub>2</sub>-deficiency on LPS-induced increase in Evans blue leakage. (A) Representative images of Evans blue leakage in lung. (B) Quantification of Evans blue leakage in lung. Evans blue (1mg/100 μl saline) was i.v. injected with or without LPS challenge, and 1 hour later mice were perfused with saline via the right ventricle, and lungs were removed. The open and closed bars represent WT and *S1pr2*<sup>-/-</sup> mice, respectively. Data represent the  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  ( $n = 4$  mice per group). The symbols \*\* and \*\*\* denote statistical significance at the levels of  $P < 0.01$  and  $P < 0.001$ , respectively. n.s., not significant.

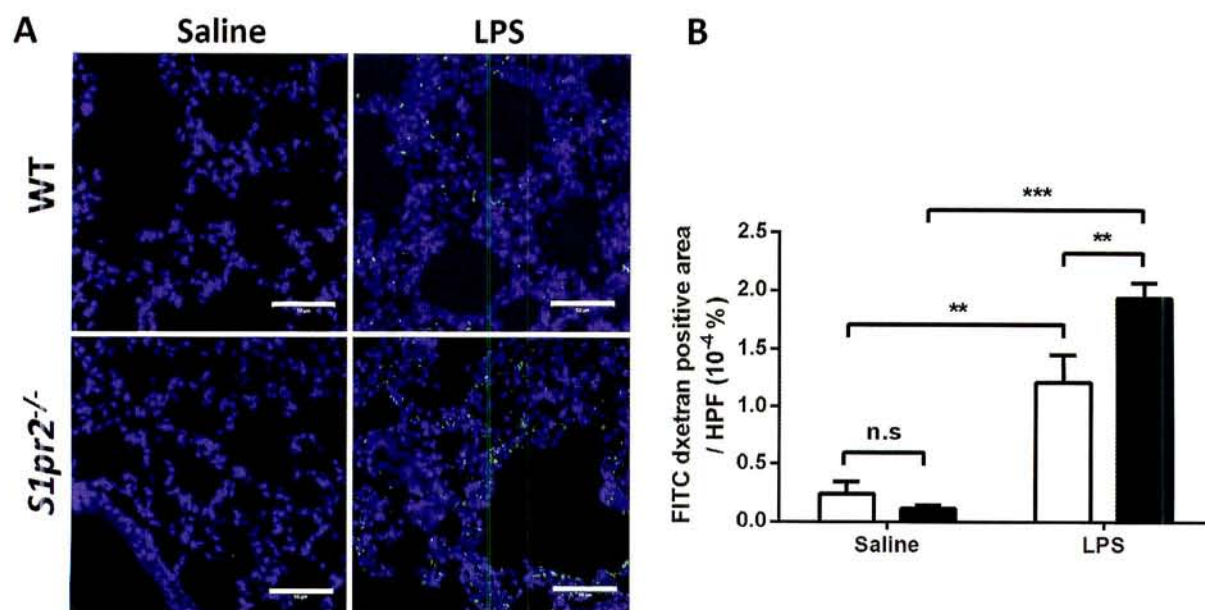


Fig. 6. LPS-induced increases in FITC-dextran leakage in lungs of WT and *S1pr2*<sup>-/-</sup> mice. (A) Representative tissue fluorescent images of FITC-dextran (green) fluorescence, and nuclear staining (DAPI, blue) in lung tissue. (B) Quantitative data of FITC-dextran extravasation. FITC-dextran (0.75mg/100 μl saline) was i.v. injected with or without LPS challenge, and 30 min later mice were perfused with saline via the right ventricle, and lungs were removed. The open and closed bars represent WT and *S1pr2*<sup>-/-</sup> mice, respectively. Data represent the  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  ( $n = 3$  mice per group). The symbols \*\* and \*\*\* denote statistical significance at the levels of  $P < 0.01$  and  $P < 0.001$ , respectively. n.s., not significant.

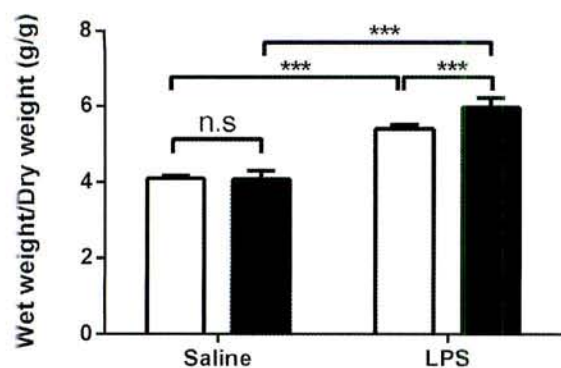


Fig. 7. LPS-induced increase in the wet-to-dry lung weight ratio in WT and *S1pr2*<sup>-/-</sup> mice. Mice were intratracheally given saline or LPS. Twenty-four hour later, lungs were removed and the wet-to-dry lung weight ratio was calculated. The open and closed bars represent WT and *S1pr2*<sup>-/-</sup> mice, respectively. Data represent the  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  ( $n = 7$  mice per group). The symbol \*\*\* denotes statistical significance at the level of  $P < 0.001$ , respectively. n.s., not significant.

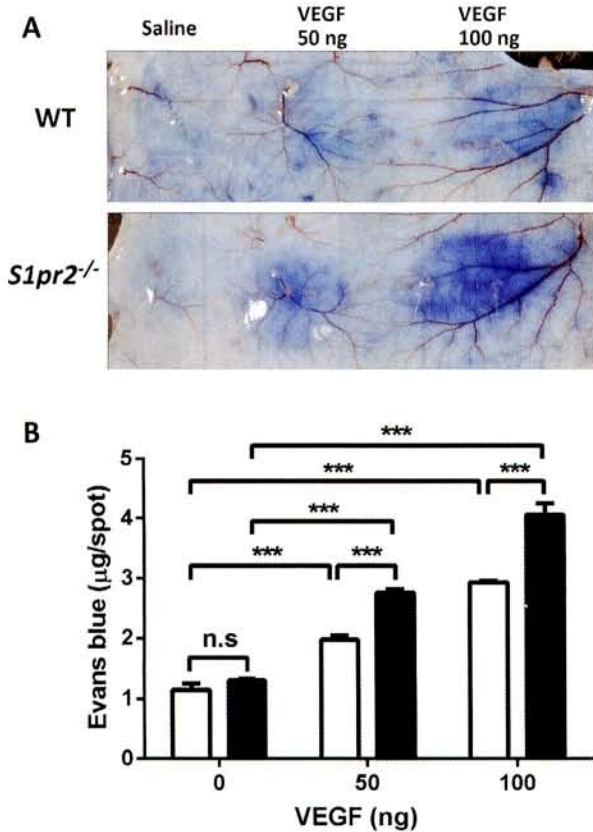


Fig. 8. Effects of S1P<sub>2</sub>-deficiency on vascular permeability induced by VEGF. (A) Representative photographs of Evans blue extravasation in skin. (B) Quantification of Evans blue extravasation in skin. Mice that had been given i.v. injection of Evans blue received intradermal injection of VEGF at the indicated doses 10 min later. The open and closed bars represent WT and *S1pr2*<sup>-/-</sup> mice, respectively. Data represent the  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  ( $n = 3$  mice per group). The symbol \*\*\* denotes statistical significance at the level of  $P < 0.001$ . n.s., not significant.

*S1pr2*<sup>-/-</sup>マウスのFITC標識デキストラン血管外漏出が野生型マウスの約1.6倍高値であった ( $P < 0.01$ ).

さらに、LPS投与により引き起こされる肺浮腫を評価した。野生型マウス及び*S1pr2*<sup>-/-</sup>マウス両者において、LPS投与により肺の湿重量/乾燥重量比が増加し(生理的食塩水投与群との比較において、野生型マウス： $P < 0.001$ , *S1pr2*<sup>-/-</sup>マウス： $P < 0.001$ ) (図7), LPSが肺浮腫を引き起こしたことを示した。野生型マウスと*S1pr2*<sup>-/-</sup>マウスの比較では、生理的食塩水投与で両群マウスの湿重量/乾燥重量比に差は見られなかったが、LPS投与後には*S1pr2*<sup>-/-</sup>マウスが野生型マウスに比較して有意な高値を示した( $P < 0.001$ )。

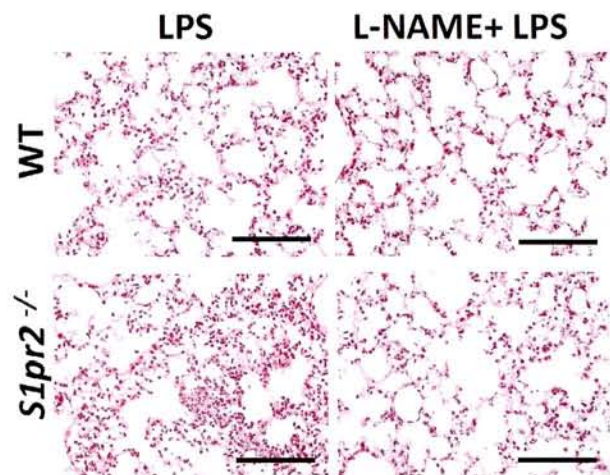


Fig. 9. Effects of L-NAME on LPS-induced acute lung injury in WT and *S1pr2*<sup>-/-</sup> mice. Representative images of HE-stained sections of lung ( $n = 2$  mice per group). (magnification x400). The lungs were removed 12 hours after intratracheal administration of LPS or saline. Bar=100 μm.

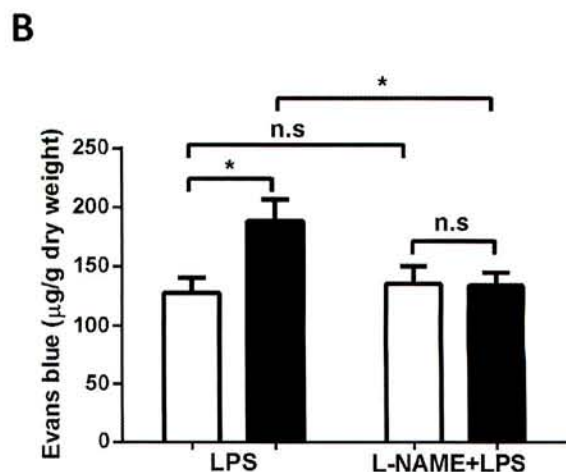
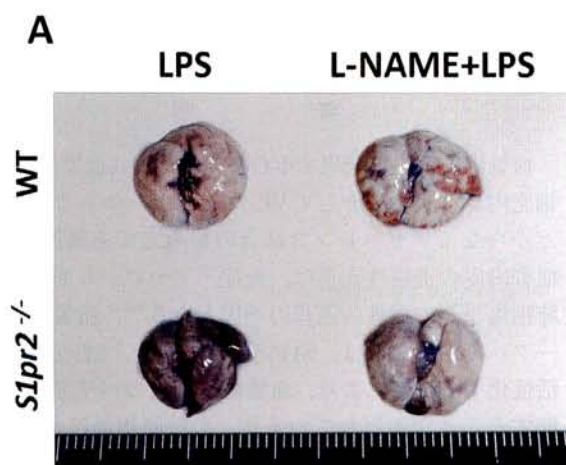


Fig. 10. Effects of L-NAME on LPS-induced increases in Evans blue leakage in lung of WT and *S1pr2*<sup>-/-</sup> mice. (A) Representative images of Evans blue leakage in lung. (B) Quantification of Evans blue leakage in lungs. Mice were injected with saline or L-NAME (100mg/kg i.v.) 10 min before intratracheal injection of LPS and Evans blue, and lungs were removed as in Fig. 5. The open and closed bars represent WT and *S1pr2*<sup>-/-</sup> mice, respectively. Data represent the  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  ( $n = 4$  mice per group). The symbol \* denotes statistical significance at the level of  $P < 0.05$ . n.s., not significant.



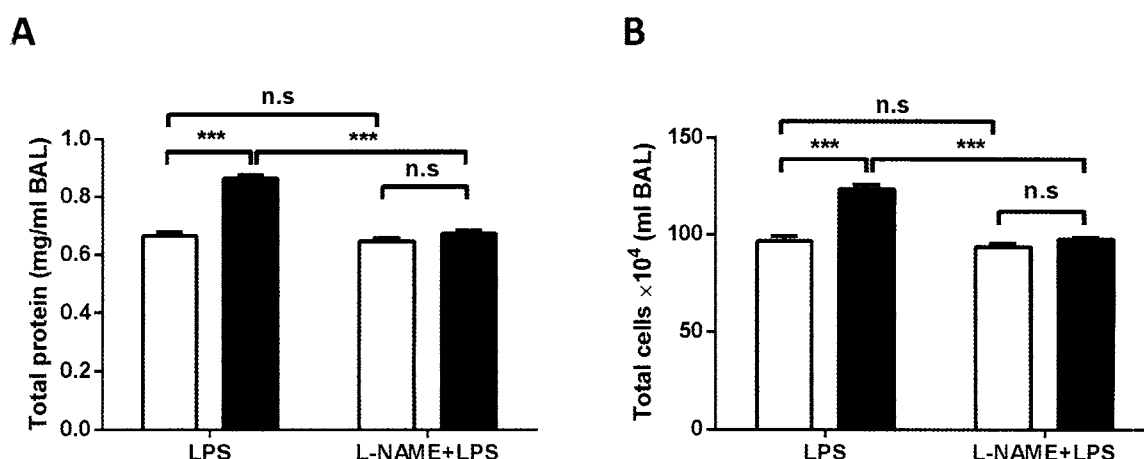


Fig. 11. Effects of L-NAME on LPS-induced increases in total protein concentration and total cell number in BALF. (A) Total protein concentration in BALF. (B) Total cell number in BALF. Mice were injected with saline or L-NAME (100mg/kg i.v.) 10 min before intratracheal injection of LPS, and 12 hour later BALF was prepared and analyzed as in Fig. 2. The open and closed bars represent WT and *S1pr2*<sup>-/-</sup> mice, respectively. Data represent the  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  ( $n = 3$  mice per group). The symbol \*\*\* denote statistical significance at the level of  $P < 0.001$ . n.s, not significant.

以上の結果 (図1-7) は、LPS誘発肺損傷モデルにおいて、*S1pr2*<sup>-/-</sup>マウスでは野生型マウスに比較して、LPSによって引き起こされる肺血管透過性亢進と肺組織中への炎症細胞浸潤が増強していることを示している。

次に、*S1pr2*<sup>-/-</sup>マウスにおける肺血管透過性亢進が血管内皮自体の反応性の違いによるか否かを検討する目的で、Miles アッセイを用いてVEGFに対する皮膚血管内支の透過性亢進反応を評価した。野生型及び*S1pr2*<sup>-/-</sup>マウスにおいて、VEGFは容量依存的に皮膚におけるエバンスブルー色素漏出の増加、すなわち血管透過性の亢進を引き起こした (図8)。*S1pr2*<sup>-/-</sup>マウスと野生型マウスの比較では、いずれの量のVEGFでも*S1pr2*<sup>-/-</sup>マウスのエバンスブルー色素漏出がより高値であった ( $P < 0.001$ )。以上の結果は、*S1pr2*<sup>-/-</sup>マウスでは血管透過性因子に対する内皮の反応が亢進していることを示唆している。

## II. *S1pr2*<sup>-/-</sup>マウスにおけるLPS誘発肺損傷の増悪に及ぼすL-NAMEの効果

著者らは最近、血管内皮細胞においてS1PがeNOSの抑制を介してさまざまな炎症性メディエーターに対する血管透過性亢進を抑制することを見出した (崔弘ら、未発表)。そこで、*S1pr2*<sup>-/-</sup>マウスにおけるLPSによる肺損傷と血管透過性亢進の増強に対するNO合成酵素阻害剤L-NAMEの効果を検討した。*S1pr2*<sup>-/-</sup>マウス及び野生型マウスに、LPS投与10分前にL-NAMEを投与した。まず、LPSによる病理組織学的変化を評価した (図9)。LPS投与6時間後では、野生型マウス、*S1pr2*<sup>-/-</sup>マウスいずれの肺組織においても、炎症細胞の浸潤、間質肥厚が認められ、その程度は野生型マウスと比べて*S1pr2*<sup>-/-</sup>マウスで顕著であった。この*S1pr2*<sup>-/-</sup>マウスにおける病理組織学的変化はL-NAME投与により抑制された。次に、肺

血管透過性をエバンスブルー色素の肺血管外漏出により評価した。L-NAMEを投与していないコントロール群では、LPS投与後6時間で*S1pr2*<sup>-/-</sup>マウスにおいて血管外へのエバンスブルー色素の漏出が野生型マウスの約1.5倍に増加していた ( $P < 0.05$ ) (図10)。この*S1pr2*<sup>-/-</sup>マウスにおけるエバンスブルー色素漏出の亢進は、L-NAME投与により完全に抑制された。さらに、BALFタンパク質濃度及び炎症細胞数増加に対するL-NAMEの効果を検討した。L-NAMEを投与していないマウスでは、LPSによるBALF中総タンパク質濃度、BALF中総細胞数増加は、*S1pr2*<sup>-/-</sup>マウスで野生型マウスのそれぞれ約1.3倍 ( $P < 0.001$ )、約1.3倍 ( $P < 0.001$ )に増加していた。この*S1pr2*<sup>-/-</sup>マウスにおけるBALFタンパク質濃度、細胞数増加は、L-NAME投与により完全に抑制された (図11)。

以上の結果から、*S1pr2*<sup>-/-</sup>マウスで観察されるLPSによる急性肺損傷、肺血管透過性の増悪には、NO合成酵素によるNO産生が関与することが示唆された。

## 考 察

血管内皮細胞に発現するGタンパク質共役型受容体は、細胞内シグナルを介してVE-カドヘリンや $\beta$ -カテニンなどからなるアドヘレンス結合の組み立てを調節する<sup>25)</sup>。血管内皮の透過性亢進は、炎症、アテローム形成、急性肺損傷などの病的過程の一因となる<sup>26)</sup>。脂質メディエーターであるS1Pは、S1P<sub>1</sub>受容体を介して低分子量Rac活性化することにより、血管内皮細胞のバリア機能を調節することが知られている<sup>21)</sup>。急性肺損傷においても、S1PやS1P<sub>1</sub>選択的アゴニストがLPS誘発急性肺損傷モデルにおける肺血管透過性や炎症に対して保護的に働くことが報告されており、急性肺損傷の病態において、S1Pは極めて重要であることが示唆されている<sup>15)-19)</sup>。しかしながら、S1P<sub>1</sub>以外のS1P受容体の急性肺損傷における

役割は不明である。本研究では、血管内皮細胞に発現し、かつ細胞遊走や細胞増殖などの作用においてS1P<sub>1</sub>とは逆の作用を示すS1P<sub>2</sub>に着目し<sup>1)2)24)</sup>、LPSによる急性肺損傷モデルにおけるS1P<sub>2</sub>の役割をS1pr2<sup>-/-</sup>マウスを用いて検討した。

本研究ではまず、S1pr2<sup>-/-</sup>マウスにおいて、野生型マウスと比べてLPSにより誘発される急性肺損傷の増悪が見られることを示した(図1)。LPS誘発肺損傷モデルは急性肺損傷の病態を研究するモデルとして広く用いられており、LPSにより肺胞上皮細胞やマクロファージなどが活性化されると、TNF $\alpha$ やIL-6などの炎症性サイトカインや活性酸素種などの組織損傷性物質が放出される結果、血管内皮細胞の損傷、肺胞上皮細胞のさらなる損傷が生じ、血管透過性亢進が起これ、その結果、透過性亢進型の肺水腫とマクロファージ、好中球などの炎症性細胞の浸潤が惹起されると考えられている<sup>27)28)</sup>。実際に、LPS気管内投与24時間後の野生型マウスおよびS1pr2<sup>-/-</sup>マウスの肺組織において、LPSによる肺胞水腫、肺胞壁の肥厚および炎症性細胞の浸潤を伴った血管透過性亢進型急性肺損傷の病理像を認めた。そしてこれらの異常は野生型マウスと比較してS1pr2<sup>-/-</sup>マウスで高度であった(図1)。また、S1pr2<sup>-/-</sup>マウスでは、野生型マウスと比較してLPSによるBALF中総タンパク質濃度増加(図2A)、総細胞数増加(図2B)および好中球増加(図2D)がより高度であった。さらに、S1pr2<sup>-/-</sup>マウスでは野生型マウスと比較して、LPS投与による肺のMCP-1 mRNA発現増加の亢進傾向も観察された(図3)。以上の結果から、S1P<sub>2</sub>遺伝子欠損マウスではLPSにより誘発される急性肺損傷を増悪すること、すなわちS1P<sub>2</sub>はLPS誘発性急性肺損傷に対して防御的に働くことを初めて明らかにした。

著者らはこれまでに、ほとんどの組織においてS1P<sub>2</sub>を発現している主要な細胞は血管内皮細胞であることを明らかにしている<sup>24)</sup>。実際に、S1pr2<sup>-/-</sup>マウスにおいて、野生型マウスと比較して皮下組織におけるVEGFによる血管透過反応の亢進を認めたことから、S1P<sub>2</sub>は血管透過性因子に対する血管透過性反応を抑制していることが明らかである(図8)。加えて、LPS気管内投与24時間後のS1pr2<sup>-/-</sup>マウスでは、野生型マウスと比較してエバンスブルー色素(図5)とFITC標識デキストラン(図6)の肺血管外漏出が亢進し、さらに肺水腫(図7)が高度であった。以上の結果から、血管内皮細胞に発現するS1P<sub>2</sub>はLPS投与による肺血管透過性に対して抑制的に働いていること、さらに、S1P<sub>2</sub>遺伝子欠損によるLPS誘発性急性肺損傷の増悪には肺血管透過性の亢進が少なくとも一部は関与すると考えられる。

血管透過性亢進を示す病態においてNOが重要な役割を果たしていることが知られている<sup>29)</sup>。また、著者らは最近、血管内皮細胞においてS1P<sub>2</sub>がeNOSを抑制することによって、さまざまな炎症性メディエーターに対する血管透過性亢進を抑制することを見出した(崔弘ら、未

発表)。そこで、S1pr2<sup>-/-</sup>マウスにおけるLPSによる肺損傷と血管透過性亢進の増強に対する非選択的NO合成酵素阻害剤L-NAMEの効果を検討した。S1pr2<sup>-/-</sup>マウスでは、L-NAME投与により惹起されるLPS誘発性急性肺損傷、エバンスブルー色素の肺血管外漏出、およびBALF中の総タンパク質濃度と細胞数増加が抑制された(図9-11)。一方、野生型マウスではL-NAME投与による影響は認められなかった(図9-11)。すなわち、S1P<sub>2</sub>欠損にともなう血管透過性亢進や炎症細胞浸潤の“亢進”にはNO合成酵素・NOが関与しているが、野生型マウスにおけるLPSによる肺損傷にはNO合成酵素・NOは関与していないと考えられた。NO合成酵素には、内皮に発現する酵素eNOS、誘導型酵素(inducible NO synthase, iNOS)および神経型酵素(neuronal NO synthase, nNOS)の3種のアイソフォームが存在する<sup>30)</sup>。このうち主に血管内皮細胞に発現するeNOSと炎症細胞、肺胞マクロファージ、肺胞上皮などにおいて発現が誘導されるiNOSがS1P<sub>2</sub>遺伝子欠損によるLPS誘発性肺損傷と血管透過性亢進の増強に関与している可能性が考えられる<sup>31)</sup>。S1P<sub>2</sub>が血管内皮細胞の他に、マクロファージにも発現していることはこの可能性を示唆している。

eNOSが産生するNOが炎症性メディエーターである血小板活性化因子(platelet-activating factor, PAF)やVEGFによる血管透過性亢進に関与することが最近報告された<sup>32)33)</sup>。また、PAF静注アナフィラキシーマウスモデルおよび牛血清アルブミン感作による能動性全身性アナフィラキシーモデルにおいて、Akt(protein kinase B)/eNOS経路により産生されるNOが重要な役割を果たしていることが示された<sup>34)</sup>。NOによるアドヘレンス結合の構成タンパク質 $\beta$ -カテニンのS-ニトロシル化とその結果生ずるアドヘレンス結合の分解が、VEGFによる血管内皮透過性亢進の分子機構であることが示唆されている<sup>35)</sup>。著者らは最近、S1pr2<sup>-/-</sup>マウスアナフィラキシーモデルおよびin vitro培養細胞系の研究から、血管内皮細胞に発現するS1P<sub>2</sub>がAkt/eNOS経路の抑制を介して血管透過性を抑制することを見出した(崔弘ら、未発表)。S1pr2<sup>-/-</sup>マウスにおいてLPS誘発性急性肺損傷が増悪した理由として、S1P<sub>2</sub>欠損により内皮細胞におけるAkt/eNOS経路が活性化され、その結果産生された過剰なNOにより肺血管透過性が亢進した可能性が考えられ、今後の検証が必要である。

LPS誘発肺損傷においては、iNOSの関与もさまざまな研究によって示唆されている。LPSは炎症細胞、肺胞マクロファージなどに作用し、iNOSの誘導を介したNO産生促進および炎症性サイトカイン産生促進により肺損傷と血管透過性を亢進すると考えられている<sup>27)28)</sup>。実際に、LPS誘発性敗血症モデルによる急性肺損傷において、iNOSノックアウトマウスは野生型マウスと比較して、肺の浮腫と白血球の肺への浸潤が減弱することが示されている<sup>36)</sup>。したがって、S1P<sub>2</sub>欠損がLPSにより惹

起されるこの過程を増悪させる可能性が考えられる。これまでに *S1pr2*<sup>-/-</sup>マウスにおいて、角膜や網膜における病的な血管新生に関与する炎症促進因子シクロオキシゲナーゼ2の発現を促進することが報告されている<sup>37)</sup>。しかしながら、肺組織中の血管内皮細胞や炎症細胞に発現する *S1P*<sub>2</sub>が実際にLPSに対して炎症促進的に働くか否かは現時点では不明である。今後、*S1P*<sub>2</sub>とeNOSあるいはiNOSの二重ノックアウトマウスの解析やシクロオキシゲナーゼ2をはじめとする炎症経路の活性化における*S1P*<sub>2</sub>の役割を検討する必要がある。また、単離細胞を用いたin vitro実験や骨髄移植実験を行うことにより、LPS誘発急性肺損傷における宿主および骨髄由来細胞の*S1P*<sub>2</sub>の役割を個別に検討する必要がある。

造血細胞選択的にSphk1, Sphk2を欠損するマウスでは、定常時および炎症時ともに血管透過性が亢進している<sup>20)</sup>。また*S1P*<sub>1</sub>アゴニスト投与はLPSによる肺血管透過性を低下させる<sup>13)-15)</sup>。したがって、*S1P*は*S1P*<sub>1</sub>を介して血管バリア機能維持に関わる。本研究では、以前報告されている結果と同様に<sup>10)</sup>、LPS気管内投与による6時間後の肺において、*S1P*合成酵素であるSphK1のmRNA発現の増加が観察された(図4)。また、*S1P*分解酵素であるSPP1のmRNA発現の減少も観察されたことから(図4)、LPSにより肺組織の*S1P*量が増加していると予想される。以上の結果から、LPSにより産生された*S1P*が*S1P*<sub>1</sub>-G<sub>i</sub>経路および*S1P*<sub>2</sub>-G<sub>12/13</sub>経路を介して、肺血管透過性に対して保護的に働いていると考えられる。

*S1P*は血管内皮細胞のバリア機能を強化することで血管透過性に対して抑制的に働くことが知られており、このバリア機能の強化には*S1P*<sub>1</sub>が重要であることが示されてきた<sup>3)</sup>。しかし、血管内皮細胞に発現している*S1P*<sub>2</sub>のin vivoにおけるバリア機能については、ほとんど理解されていなかった。本研究は、定常時および炎症時において、ともに血管透過性を制御する*S1P*<sub>1</sub>と比べて、*S1P*<sub>2</sub>は急性肺損傷などの病的な血管透過性亢進において重要な役割を果たしていることを明らかにした。*S1P*<sub>2</sub>選択的アゴニストは未だ十分な治療法のない急性肺損傷の新しい治療薬として期待される。

## 結 論

*S1pr2*<sup>-/-</sup>マウスを用いてLPS誘発急性肺損傷モデルを作成し、肺の病理学的所見、肺胞への炎症細胞の浸潤、肺における炎症性サイトカインのmRNA発現、および肺血管透過性などを解析することにより急性肺損傷における*S1P*<sub>2</sub>の役割を検討し、以下の結論を得た。

1. LPSの気管内投与による炎症性細胞の浸潤、肺胞浮腫を特徴とした血管透過性亢進型急性肺損傷は、病理組織像、肺胞洗浄液の所見及び炎症性サイトカインのmRNA発現レベルにおいて、野生型マウスに比較して*S1pr2*<sup>-/-</sup>マウスでより高度であった。

2. LPS投与により*S1P*合成酵素SphK1のmRNA発現が増加し、*S1P*分解酵素SPP1のmRNA発現は逆に低下した。SphK1mRNA発現増加は、野生型マウスに比較して*S1pr2*<sup>-/-</sup>マウスでより高度であった。
3. LPS投与は静脈内に投与したエバンスブルー色素及びFITC標識デキストランの血管外漏出を引き起こした。この漏出は、野生型マウスに比較して*S1pr2*<sup>-/-</sup>マウスでより高度であった。LPS投与による肺浮腫は、野生型マウスに比較して*S1pr2*<sup>-/-</sup>マウスでより高度であった。
4. VEGFは容量依存的に皮膚におけるエバンスブルー色素漏出の増加を引き起こしたが、野生型マウスに比較して*S1pr2*<sup>-/-</sup>マウスでより高度であった。
5. 非選択的NO合成酵素阻害薬L-NAMEの投与は、*S1pr2*<sup>-/-</sup>マウスで見られるLPSによる病理組織学的変化、肺胞洗浄液の異常及びエバンスブルー色素の血管外漏出肺損傷の増悪を改善した。
6. 以上の結果から、*S1P*<sub>2</sub>はNO合成酵素の抑制を介してLPS誘発急性肺損傷を抑制することが示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導を賜りました血管分子生理学分野 多久和陽教授、岡本安雄准教授に深甚なる謝意を捧げます。また研究の遂行にあたり御助言を賜りました血管分子生理学分野 吉岡和晃先生、多久和典子先生、教室員の方々に厚く御礼申し上げます。正常マウス肺組織所見についてご教授をいただいた佐々木素子先生(形態機能病理学)に、御礼申し上げます。留学の機会を与え、激励してくれた延辺大学医学部の関係者に感謝します。

## 文 献

- 1) Takuwa Y, Okamoto Y, Yoshioka K, Takuwa N. Sphingosine-1-phosphate signaling and biological activities in the cardiovascular system. *Biochim Biophys Acta* 1781: 483-488, 2008
- 2) Takuwa Y, Okamoto Y, Yoshioka K, Takuwa N. Sphingosine-1-phosphate signaling in physiology and diseases. *Biofactors* 38: 329-337, 2012
- 3) Yatomi Y, Igarashi Y, Yang L, Hisano N, Qi R, Asazuma N, Satoh K, Ozaki Y, Kume S. Sphingosine 1-phosphate, a bioactive sphingolipid abundantly stored in platelets, is a normal constituent of human plasma and serum. *J Biochem* 121: 969-973, 1997
- 4) Spiegel S, Milstien S. Functions of the multifaceted family of sphingosine kinases and some close relatives. *J Biol Chem* 282: 2125-2129, 2007
- 5) Pappu R, Schwab SR, Cornelissen I, Pereira JP, Regard JB, Xu Y, Camerer E, Zheng YW, Huang Y, Cyster JG, Coughlin SR. Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. *Science* 316: 295-298, 2007
- 6) Venkataraman K, Lee YM, Michaud J, Thangada S, Ai Y, Bonkovsky HL, Parikh NS, Habrukowich C, Hla T. Vascular endothelium as a contributor of plasma sphingosine 1-phosphate. *Circ Res* 102: 669-676, 2008
- 7) Kawahara A, Nishi T, Hisano Y, Fukui H, Yamaguchi A, Mochizuki N. The sphingolipid transporter spns2 functions in

migration of zebrafish myocardial precursors. *Science* 323, 524-527, 2009

- 8) Mandala SM, Thornton R, Galve-Roperh I, Poulton S, Peterson C, Oliver A, Bergstrom J, Kurtz MB, Spiegel S. Sphingoid base 1-phosphate phosphatase: a key regulator of sphingolipid metabolism and stress response. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 150-155, 1998
- 9) Zhou J, Saba JD. Identification of the first mammalian sphingosine phosphate lyase gene and its functional expression in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 242: 502-507, 1998
- 10) Ishii I, Fukushima N, Ye X, Chun J. Lysophospholipid receptors: signaling and biology. *Annu Rev Biochem* 73: 321-354, 2004
- 11) Okamoto H, Takuwa N, Yokomizo T, Sugimoto N, Sakurada S, Shigematsu H, Takuwa Y. Inhibitory regulation of Rac activation, membrane ruffling, and cell migration by the G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor EDG5 but not EDG1 or EDG3. *Mol Cell Biol* 20: 9247-9261, 2000
- 12) Sugimoto N, Takuwa N, Okamoto H, Sakurada S, Takuwa Y. Inhibitory and stimulatory regulation of Rac and cell motility by the G12/13-Rho and Gi pathways integrated downstream of a single G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor isoform. *Mol Cell Biol* 23: 1534-1545, 2003
- 13) Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 342: 1334-1349, 2000
- 14) Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin DP, Neff M, Stern EJ, Hudson LD. Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med* 353: 1685-1693, 2005
- 15) Peng X, Hassoun PM, Sammani S, McVerry BJ, Burne MJ, Rabb H, Pearse D, Tudor RM, Garcia JG. Protective effects of sphingosine 1-phosphate in murine endotoxin-induced inflammatory lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 169: 1245-1251, 2004
- 16) McVerry BJ, Peng X, Hassoun PM, Sammani S, Simon BA, Garcia JG. Sphingosine 1-phosphate reduces vascular leak in murine and canine models of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 170: 987-993, 2004
- 17) Sammani S, Moreno-Vinasco L, Mirzapourzadeh T, Singleton PA, Chiang ET, Evenoski CL, Wang T, Mathew B, Husain A, Moitra J, Sun X, Nunez L, Jacobson JR, Dudek SM, Natarajan V, Garcia JG. Differential effects of Sphingosine 1-phosphate receptors on airway and vascular barrier function in the murine lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 43: 394-402, 2010
- 18) Wadgaonkar R, Patel V, Grinkina N, Romano C, Liu J, Zhao Y, Sammani S, Garcia JG, Natarajan V. Differential regulation of sphingosine kinases 1 and 2 in lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 296: L603-L613, 2009
- 19) Zhao Y, Gorshkova IA, Berdyshev E, He D, Fu P, Ma W, Su Y, Usatyuk PV, Pendyala S, Oskouian B, Saba JD, Garcia JG, Natarajan V. Protection of LPS-induced murine acute lung injury by sphingosine-1-phosphate lyase suppression. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45: 426-435, 2011
- 20) Blaho VA, Hla T. Regulation of mammalian physiology, development, and disease by the sphingosine 1-phosphate and

lysophosphatidic acid receptors. *Chem Rev* 111: 6299-6320, 2011

- 21) Garcia JG, Liu F, Verin AD, Birukova A, Dechert MA, Gerthoffer WT, Bamberg JR, English D. Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement. *J Clin Invest* 108: 689-701, 2001
- 22) Camerer E, Regard JB, Cornelissen I, Srinivasan Y, Duong DN, Palmer D, Pham TH, Wong JS, Pappu R, Coughlin SR. Sphingosine-1-phosphate in the plasma compartment regulates basal and inflammation-induced vascular leak in mice. *J Clin Invest* 119: 1871-1879, 2009
- 23) Sanchez T, Skoura A, Wu MT, Casserly B, Harrington EO, Hla T. Induction of vascular permeability by the sphingosine-1-phosphate receptor-2 (S1P2R) and its downstream effectors ROCK and PTEN. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 1312-1318, 2007
- 24) Du W, Takuwa N, Yoshioka K, Okamoto Y, Gonda K, Sugihara K, Fukamizu A, Asano M, Takuwa Y. S1P(2), the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, negatively regulates tumor angiogenesis and tumor growth in vivo in mice. *Cancer Res* 70: 772-781, 2010
- 25) Korhonen H, Fisslthaler B, Moers A, Wirth A, Habermehl D, Wieland T, Schutz G, Wettschureck N, Fleming I, Offermanns S. Anaphylactic shock depends on endothelial Gq/G11. *J Exp Med* 206: 411-420, 2009
- 26) Mehta D, Malik AB. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev* 86: 279-367, 2006
- 27) Wang HM, Bodenstein M, Markstaller K. Overview of the pathology of three widely used animal models of acute lung injury. *Eur Surg Res* 40: 305-316, 2008
- 28) Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295: L379-L399, 2008
- 29) Durán WN, Breslin JW, Sánchez FA. The NO cascade, eNOS location, and microvascular permeability. *Cardiovasc Res* 87: 254-261, 2010
- 30) Andrew PJ, Mayer B. Enzymatic formation of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 43: 521-531, 1999
- 31) Kobzik L, Bredt DS, Lowenstein CJ, Drazen J, Gaston B, Sugarbaker D, Stamler JS. Nitric oxide synthase in human and rat lung; immunocytochemical and histochemical localization. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9: 371-377, 1993
- 32) Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, Izumi Y, Ang J, Yun CO, Buerk DG, Huang PL, Jain RK. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 2604-2609, 2001
- 33) Hatakeyama T, Pappas PJ, Hobson RW 2<sup>nd</sup>, Boric MP, Sessa WC, Duran WN. Endothelial nitric oxide synthase regulates microvascular hyperpermeability in vivo. *J Physiol* 574: 275-281, 2006
- 34) Cauwels A, Janssen B, Buys E, Sips P, Brouckaert P. Anaphylactic shock depends on PI3K and eNOS-derived NO. *J Clin Invest* 116: 2244-2251, 2006



- 35) Thibeault S, Rautureau Y, Oubaha M, Faubert D, Wilkes BC, Delisle C, Gratton JP. *S*-nitrosylation of beta-catenin by eNOS-derived NO promotes VEGF-induced endothelial cell permeability. *Mol Cell* 39: 468-476, 2010
- 36) Kristof AS, Goldberg P, Laubach V, Hussain SN. Role of inducible nitric oxide synthase in endotoxin-induced acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 158: 1883-1889, 1998
- 37) Skoura A, Sanchez T, Claffey K, Mandala SM, Proia RL, Hla T. Essential role of sphingosine 1-phosphate receptor2 in pathological angiogenesis of the mouse retina. *J Clin Invest* 117: 2506-2516, 2007

**Sphingosine-1-phosphate receptor-2 is protective against lipopolysaccharide-induced acute lung injury** Hong Cui, Department of Molecular Vascular Physiology, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 Jusen Med. Soc., **121**, 106 – 118 (2012)

**Key words** sphingosine-1-phosphate, S1P<sub>2</sub>, acute lung injury, vascular permeability, nitric oxide

#### Abstract

Acute lung injury, which is associated with various underlying diseases including sepsis, other severe infections and trauma, is characterized by leukocyte infiltration into lung parenchyma, pulmonary vascular permeability increase and edema, and resultant pulmonary dysfunction. Effective therapy for acute lung injury has not yet been established although much effort has been made. The maintenance of vascular barrier integrity may afford protection against acute lung injury. We have recently observed that S1P<sub>2</sub>, which is a receptor specific for the lysophospholipid mediator sphingosine-1-phosphate, is expressed in vascular endothelial cells and involved in the regulation of vascular barrier function. In the present study, we investigated the effect of genetic deletion of S1P<sub>2</sub> on LPS-provoked acute lung injury and the mechanisms of the S1P<sub>2</sub> action in mice. In a murine model in which acute lung injury was provoked by intra-tracheal administration of LPS, genetic deletion of S1P<sub>2</sub> aggravated leukocyte infiltration in the lung parenchyma, elevation of protein concentrations and neutrophils in bronchoalveolar lavage fluid, and increases in proinflammatory cytokine mRNA expression. Genetic deletion of S1P<sub>2</sub> also aggravated LPS-induced increases in vascular permeability and pulmonary edema. Nitric oxide, which is produced by nitric oxide synthase in the endothelium, is shown to mediate an increase in vascular permeability. Administration of the nitric oxide synthase inhibitor, *N* $\omega$ -L-nitro-arginine methyl ester, protected S1P<sub>2</sub>-deleted mice from aggravation of leukocyte infiltration and vascular hyperpermeability. These observations together suggest that S1P<sub>2</sub> mediates the protection from LPS-induced acute lung injury possibly through inhibiting nitric oxide synthase, pointing to S1P<sub>2</sub> as a promising novel target for treating acute lung injury.